

**Разработка методов получения качественных гидролизатов, основанных на интеграции каталитических процессов пероксидной делигнификации и кислотного гидролиза древесины березы**

Кузнецов Б.Н.<sup>1,2</sup>, Чесноков Н.В.<sup>1,2</sup>, Яценкова О.В.<sup>1</sup>, Судакова И.Г.<sup>1</sup>,  
Скрипников А.М.<sup>1</sup>, Береговцова Н.Г.<sup>1</sup>, Шарыпов В.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт химии и химической технологии СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН,  
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок 50, стр. 24*

<sup>2</sup>*Сибирский федеральный университет, Россия, 660041, Красноярск, пр.  
Свободный, 79*

**Реферат**

Традиционные процессы кислотно-каталитического гидролиза древесины мало эффективны из-за низкого качества образующихся глюкозных растворов, загрязненных примесями, которые ингибируют ферментацию глюкозы в этанол. Эта проблема проявляется особенно остро при гидролизе древесины березы, содержащей большое количество гемицеллюлоз.

В настоящей работе предложено осуществлять получение качественных растворов глюкозы путем сернокислотного гидролиза 80 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  при 25 °С целлюлозных продуктов, образующихся при пероксидной каталитической делигнификации древесины березы. Установлено, что состав целлюлозных продуктов оказывает существенное влияние на содержание в гидролизатах глюкозы, ксилозы и примесей, ингибирующих ферментативный синтез биоэтанола: фурфурола, 5-гидроксиметилфурфурола и левулиновой кислоты. Высокие выходы глюкозы (80,4–83,5 % мас.) достигнуты при использовании целлюлозных продуктов, полученных интеграцией процессов сернокислотного гидролиза гемицеллюлоз древесины березы и пероксидной делигнификации предгидролизованной древесины в присутствии катализаторов 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и 1 %  $\text{TiO}_2$ . Концентрации ингибиторов ферментативных процессов в этих гидролизатах ниже

допустимых значений. Гидролизаты с максимальным содержанием глюкозы (86,4–88,5 % мас.) и минимальной концентрацией ингибирующих примесей получены кислотным гидролизом целлюлозных продуктов, обработанных 18 % NaOH. Для исследования состава гидролизатов использовали методы газовой хроматографии, ВЭЖХ, хромато-масс спектрометрии. Целлюлозные продукты изучены методами ИКС, РФА и химическими.

**Ключевые слова:** древесина березы, пероксидная делигнификация, катализаторы,  $H_2SO_4$ ,  $TiO_2$ , целлюлозный продукт, кислотный гидролиз, состав гидролизатов.

## Введение

Традиционные технологии кислотно-каталитического гидролиза древесины недостаточно эффективны из-за низкого качества получаемых глюкозных гидролизатов, загрязненных примесями, которые ингибируют ферментативную глюкозу в этанол и снижают его выход. К ингибирующим примесям относятся фурановые соединения, фенолы, терпены, танины, муравьиная и левоулиновая кислоты, высокомолекулярные соединения лигногуминового типа [1]. В настоящее время предпринимаются усилия, направленные на биотрансформацию ингибирующих веществ в гидролизатах путем метаболизма специфическими дрожжами. Однако технология таких процессов более сложная, чем традиционных процессов ферментации [2].

Состав и содержание ингибиторов дрожжевой ферментации глюкозы в этанол определяются природой исходного лигноцеллюлозного сырья и условиями его кислотного гидролиза [3]. Проблема образования ингибирующих примесей особенно остро проявляется при гидролизе древесины березы из-за большого содержания в ней гемицеллюлоз [4].

Для получения гидролизатов с высоким содержанием глюкозы и пониженной концентрацией нежелательных примесей целесообразно использовать гидролиз целлюлозы, выделенной из лигноцеллюлозного сырья [5]. С учетом содержания в древесине березы значительного количества

гемицеллюлоз, целесообразно предварительно осуществлять их гидролиз с получением ксилозы в качестве одного из целевых продуктов [6–8].

Качество целлюлозных продуктов, выделенных из древесины, зависит от способов ее фракционирования на основные компоненты – целлюлозу, гемицеллюлозы и лигнин. Различные способы обработки древесины позволяют варьировать как выход целлюлозных продуктов, так и содержание в них целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина. Из целлюлозных продуктов, практически не содержащих лигнин и гемицеллюлозы, путем гидролиза получают растворы с высоким содержанием глюкозы и минимальным количеством нежелательных примесей, ингибирующих ферментативные процессы [9].

На этапах фракционирования лигноцеллюлозной биомассы применяют разбавленные растворы соляной, серной, уксусной кислот и гидроксида натрия [10]. Так, в работах [11, 12] достигнуто повышение выхода биоэтанола из целлюлозы за счет последовательной обработки биомассы сначала кислотой, а затем щелочью.

В работе [13] для удаления гемицеллюлоз и облегчения последующего гидролиза целлюлозы концентрированной серной кислотой древесину березы предварительно обрабатывали в автоклаве при 165°C в течение 130 минут в присутствии воды и 1,5% мас. уксусной кислоты. Используемая для аналогичных целей водная обработка опилок березы при температурах 200–240 °C в течение 30–180 минут позволяет полностью удалить ксилан, но при этом потери в выходе целлюлозы составляют 15% мас. [14].

Для деполимеризации гемицеллюлоз в работе [15] использована предварительная обработка лигноцеллюлозной биомассы разбавленным раствором серной кислоты с последующей делигнификацией выделенной лигноцеллюлозы гидроксидом натрия.

Одним из перспективных направлений в разработке «зеленых» процессов выделения целлюлозы является пероксидная каталитическая

делигнификация лигноцеллюлозной биомассы в среде «уксусная кислота – вода» [16–18].

Традиционными катализаторами кислотных превращений целлюлозы являются минеральные кислоты  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ . Описанные в современной литературе [19–21] методы гидролиза растительного сырья разбавленными минеральными кислотами при повышенных температурах не позволяют получать из растительного сырья моносахаридов с высоким выходом.

В работе [22] проведена оптимизация процесса гидролиза мехактивированной микрокристаллической целлюлозы в присутствии сернокислотного катализатора (0,5–2,5 % мас.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) при температуре 150 °С и продолжительности 0,5–3,0 ч. Расчетными методами установлено, что оптимальные показатели достигаются при содержании сернокислотного катализатора 2,5 % мас. и продолжительности процесса 1,76 ч. В этих условиях прогнозируемый выход глюкозы составляет 65,15 % мас.

Для повышения выхода глюкозы предложено применять концентрированные кислоты для гидролиза целлюлозы [23, 24]. В работе [25] изучен двустадийный гидролиз хлопковой целлюлозы, Avicel и лигноцеллюлозы ивы 72 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  при жидкостном модуле 11 с последующим 4-х кратным разбавлением гидролизата. При этом выход глюкозы составил около 90%.

В работе [26] изучено влияние условий гидролиза микрокристаллической целлюлозы 80% серной кислотой (температуры, жидкостного модуля, продолжительности) на степень конверсии целлюлозы и на выход глюкозы. Расчетными методами проведена оптимизация процесса гидролиза МКЦ и установлено, что при температуре 25°С, продолжительности гидролиза 47 мин и жидкостном модуле 1,4 прогнозируемый выход глюкозы составит около 100%.

В гидролизате, полученном в условиях, близких к оптимальным, выход глюкозы составляет 98,7 % мас., а содержание в нем ингибиторов

ферментативных процессов (фурфурола, 5-ГМФ и левоулиновой кислоты) существенно ниже допустимых значений.

Основное преимущество использования концентрированной серной кислоты в гидролизе целлюлозы, по сравнению с ее разбавленными растворами, заключается в достижении более высокого выхода моносахаридов при комнатной температуре и атмосферном давлении при сниженных энергозатратах. Сдерживающим фактором для широкого использования концентрированной кислоты в гидролизе целлюлозы является сложность процесса ее регенерации для повторного использования.

Наиболее важными компонентами гидролизатов являются сбраживаемые в этанол гексозы. Пентозы не усваиваются основным коммерческим штаммом спиртообразующих дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, который применяется в промышленном получении этанола [3, 27]. Растворимые олигосахариды, также присутствующие в гидролизатах, не усваиваются ферментами, хотя и не являются ингибиторами биохимических процессов. Для повышения выхода этанола необходимо провести инверсию гидролизатов и повысить выход усваиваемых моносахаридов [28].

Целью данного исследования являлась разработка методов получения качественных гидролизатов для ферментативного синтеза этанола, основанных на интеграции каталитических процессов пероксидной делигнификации и кислотного гидролиза древесины березы.

## **Экспериментальная часть**

### *Исходные материалы и реактивы*

В качестве исходного сырья для получения целлюлозных продуктов использовали древесные опилки (фракция 2 – 5 мм) березы повислой (*Betula pendula*), произрастающей в Красноярском крае. Определение химического состава древесных опилок проводили по стандартным методикам [29]. Содержание основных компонентов древесины березы составило (% мас.):

целлюлоза – 46,8; лигнин – 21,7; гемицеллюлозы – 27,3; экстрактивные вещества – 3,5; зола – 0,34.

Получение целлюлозных продуктов из древесины березы осуществляли с использованием ниже описанных методик.

### *1. Пероксидная делигнификация древесины*

Делигнификацию древесины березы проводили в стеклянном реакторе, снабженном механической мешалкой и обратным холодильником. В реактор приливали 100 мл водного раствора пероксида водорода и уксусной кислоты, добавляли 10 г древесных опилок и катализатор  $\text{TiO}_2$  (1 % мас.) или серную кислоту (2 % мас.). Продолжительность процесса делигнификации при температуре 100 °С составляла 3,5–4 ч. Затем твердый остаток отделяли фильтрованием на воронке Бюхнера, промывали и высушивали при температуре 103 °С до достижения постоянной массы.

### *2. Интеграция стадий кислотного предгидролиза и пероксидной делигнификации древесины*

Древесные опилки в количестве 10 г помещали в реактор из термостойкого стекла объемом 500 мл, снабженный мешалкой, обратным холодильником и термометром. Затем приливали 80 мл водного раствора 3% мас.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Реакцию гидролиза проводили при атмосферном давлении, температуре 100°С, в течение 3–5 ч, при интенсивности перемешивания 14 об/с. Затем полученный гидролизат остужали до комнатной температуры, отфильтровывали на воронке Бюхнера, переливали в бюкс, закрывали притертой крышкой и анализировали методом газовой хроматографии. Негидролизированный древесный остаток промывали дистиллированной водой и высушивали при температуре 103°С. Конверсию древесины определяли весовым методом. Затем проводили пероксидную делигнификацию негидролизованного древесного остатка по методике 1.

### *3. Интеграция стадий пероксидной делигнификации древесины и щелочной обработки целлюлозного продукта*

Для удаления остаточных гемицеллюлоз целлюлозные продукты, полученные пероксидной делигнификацией древесины березы по методике 1, обрабатывали водным раствором 18 % NaOH при температуре кипения и гидромодуле 8 в течение 2 ч. Затем целлюлозный продукт отделяли фильтрованием на воронке Бюхнера, промывали и высушивали.

### *4. Интеграция стадий предгидролиза и пероксидной делигнификации древесины и щелочной обработки целлюлозного продукта*

Для получения целлюлозного продукта сначала осуществляли кислотный предгидролиз древесины березы по методике 2, затем проводили пероксидную делигнификацию предгидролизованной древесины по методике 1 и щелочную обработку целлюлозного продукта по методике 3.

#### *Анализ целлюлозных продуктов*

Химический анализ целлюлозных продуктов на содержание целлюлозы, лигнина и гемицеллюлоз проводили по традиционным методикам [29].

Морфологию целлюлозных продуктов изучали с использованием растрового электронного микроскопа «ТМ-1000 HITACHI» (Япония) с ускоряющим напряжением 15 kV и с увеличением от 100 до 10 000 крат с разрешением 30 нм.

Степень полимеризации (СП) целлюлозы определяли в железовиннонатриевом комплексе в соответствии с ГОСТ 25438-82 на капиллярном вискозиметре типа ВПЖ-3 по методике [30].

#### *Кислотный гидролиз целлюлозного продукта*

Полученные из древесины березы целлюлозные продукты перед гидролизом подвергали механической обработке в энергонапряженной мельнице-активаторе АГО-2 в течение 30 мин.

Гидролиз мехобработанного продукта проводили в стеклянном реакторе 80 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при атмосферном давлении, температуре 25°C в течение 50 мин при жидкостном модуле 1,4 и постоянном перемешивании. Затем в

гидролизат добавляли 20 мл дистиллированной воды для превращения растворимых олигосахаридов в моносахаридов и осуществляли дополнительный гидролиз (инверсию) при температуре 100 °С в течение 1 ч. Затем полученный гидролизат охлаждали до комнатной температуры и отфильтровывали на воронке Бюхнера. Конверсию целлюлозы определяли весовым методом.

#### *Анализ гидролизатов целлюлозы*

Индивидуальный состав и содержание моносахаридов в гидролизатах исследовали с использованием газового хроматографа «VARIAN-450 GC» с пламенно-ионизационным детектором на капиллярной колонке VF- 624ms длиной 30 м, внутренним диаметром – 0,32 мм. Условия хроматографирования: газ носитель – гелий; температура инжектора 250°С; начальная температура колонки 50°С (5 мин), подъем температуры до 180°С со скоростью 10 °С/мин, выдержка при 180°С 37 мин. Температура детектора 280°С. Для регистрации выхода олигосахаридов после 55 мин анализа поднимали температуру до 250°С (10°С/мин) и выдерживали колонку при данной температуре 30 мин.

Пробу гидролизата предварительно подвергали дериватизации по методике [31]. В качестве силилирующего реагента использовали смесь триметилхлорсилана и гексаметилдисилазана в среде пиридина, а в качестве внутреннего стандарта – сорбит. Полученная хроматограмма включает пики всех содержащихся в пробе гидролизата таутомеров моносахаридов. Рассчитывали отношение площадей каждого характеристического пика моносахарида к площади пика внутреннего стандарта ( $S_i/S_{ст}$ ). По этим соотношениям с помощью градуировочного графика находили массу каждого моносахарида в пробе гидролизата.

Выход глюкозы в % от массы целлюлозного продукта рассчитывали по уравнению [32]:

$$Вых._{гл.} = \frac{C_{гл}}{C_{ц}} \cdot 100\%, \text{ где}$$

$C_{гл}$  – концентрация глюкозы, определенная в гидролизате, (мг/мл).



$C_{ц}$  – исходное массовое содержание целлюлозного продукта в реакционной смеси, (мг/мл).

Выход ксилозы и маннозы определяли аналогичным образом.

Стандартами для анализов полученных растворов моносахаров являлись глюкоза кристаллическая гидратная (ГОСТ 975–88), D-ксилоза (Panreac, Germany), D-манноза (Panreac, Germany), D-сорбит (Panreac, Germany), фурфурол (ГОСТ 10930-74), 5-гидроксиметилфурфурол, 99% (Aldrich, USA), левулиновая кислота, 99% (Aldrich, USA).

Определение количественного содержания микропримесей фурфурола, 5-гидроксиметилфурфурола (5-ГМФ) и 4-оксопентановой (левулиновой) кислоты в образцах глюкозных гидролизатов проводили методом ВЭЖХ с использованием жидкостного микроколоночного хроматографа "Миличром А-02" (ЗАО Институт хроматографии «Эконова», г.Новосибирск) со спектрофотометрическим сканирующим детектором УФ-диапазона (190-360 нм) [33]. Использовали колонку из нержавеющей стали (2,0 x 75 мм) упакованную силикагелем ProntoSIL-120-5-C18 AQ, с размером зерна 5,0 мкм. Температура колонки  $35,0 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ . Подвижная фаза: ацетонитрил (НПК «Криохром», г.Санкт-Петербург, сорт 0) - деионизированная вода в соотношении 3:97, скорость потока 100 мкл/мин. Дозируемый объем раствора исследуемого вещества – 4 мкл.

Концентрация (мг/мл) фурфурола, 5-ГМФ и левулиновой кислоты в пробе, введенной в хроматограф, рассчитывалась автоматически программой сбора и обработки хроматографической информации «Мультихром-СПЕКТР»®.

Качественное содержание микропримесей органических веществ в гидролизатах проводили методом хромато–масс–спектрометрии с использованием хроматографа Agilent 7890A. Гидролизаты нейтрализовали гидроксидом бария, согласно [34], подвергали экстракции диметиловым эфиром и проводили анализ представительной пробы смеси (1–5 мл).

Качественную идентификацию в гидролизатах примесей индивидуальных веществ осуществляли путем сравнения их экспериментально полученных масс-спектров с данными библиотеки масс-спектров.

### **Результаты и обсуждение**

Актуальной задачей в ферментативном синтезе биоэтанола из лигноцеллюлозной биомассы является повышение качества глюкозных гидролизатов [5, 35]. Наиболее эффективные методы получения качественных гидролизатов основаны на предварительном удалении из древесины экстрактивных веществ, гемицеллюлоз и лигнина. Путем кислотно-каталитического гидролиза образующейся при этом целлюлозы возможно получение гидролизатов с высоким содержанием глюкозы и пониженной концентрацией нежелательных примесей [9].

Ранее нами был осуществлен подбор условий пероксидной делигнификации опилок древесины березы в среде «уксусная кислота – вода» в присутствии суспензии катализатора  $\text{TiO}_2$  [36]. В данной работе сопоставлен состав глюкозных гидролизатов из целлюлозных продуктов, которые были получены из древесины березы пероксидной каталитической делигнификацией, интегрированной с кислотным предгидролизом древесины и щелочной обработкой целлюлозного продукта.

В качестве катализаторов пероксидной делигнификации древесины березы использовали  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и  $\text{TiO}_2$ .

Данные о влиянии условий пероксидной делигнификации древесины березы на выход и состав полученных целлюлозных продуктов, а также на степень их полимеризации представлены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние катализаторов на выход, состав и степень полимеризации целлюлозных продуктов, полученных пероксидной делигнификацией древесины березы (температура 100°C, 4 % мас. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 30 % мас. CH<sub>3</sub>COOH, гидромодуль 10, продолжительность 4 ч)

Номер образца	Катализатор	Выход целлюлозного продукта*, % мас.	Состав продукта**, % мас.			СП***
			целлюлоза	гемицеллюлозы	лигнин	
1	2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	59,0	78,4	17,5	0,5	570
2	0,5% TiO <sub>2</sub>	66,0	72,3	20,2	2,9	670
3	1% TiO <sub>2</sub>	64,3	74,6	21,5	2,5	675
*— от массы древесины, ** — от массы целлюлозного продукта, *** — степень полимеризации.						

Высокий выход целлюлозных продуктов (до 66,0 % мас.) достигается при температуре пероксидной делигнификации древесины 100 °C в присутствии катализатора TiO<sub>2</sub>. В этих условиях протекает интенсивная деполимеризация лигнина с образованием низкомолекулярных продуктов, но сохраняется до 2,9 % мас. остаточного лигнина. Также в целлюлозных продуктах остается значительное количество гемицеллюлоз – до 21,5 % мас. (табл. 1). Применение серной кислоты в качестве катализатора пероксидной делигнификации древесины снижает, по сравнению с катализатором TiO<sub>2</sub>, выход целлюлозного продукта с 66,0 до 59,0% мас. и содержание в нем лигнина и гемицеллюлоз до 0,5 и 17,5 % мас., соответственно. По мере удаления лигнина и гемицеллюлоз из древесины уменьшается степень полимеризации целлюлозного продукта (табл. 1).

Целлюлозные продукты, содержащие 93,1–95,5 % мас. целлюлозы и 1,7–2,5 % мас. гемицеллюлоз и менее 1 % мас. лигнина были получены двумя другими способами. Один из них включает дополнительную обработку целлюлозного продукта 18 % NaOH при 100°C, другой – предгидролиз древесины 3 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, последующую пероксидную делигнификацию и щелочную обработку целлюлозного продукта.

Известно, что реакционная способность целлюлозы в кислотном гидролизе повышается при ее механической активации [37–39]. Методом

растровой электронной микроскопии (РЭМ) установлено, что механическая обработка в АГО-2 сопровождается диспергированием и повышением однородности целлюлозных продуктов, при этом размер их частиц уменьшается с 60–70 мкм (исходный образец) до 5–25 мкм (рис. 1). В результате механической обработки также снижается степень полимеризации целлюлозных продуктов до 130–180.

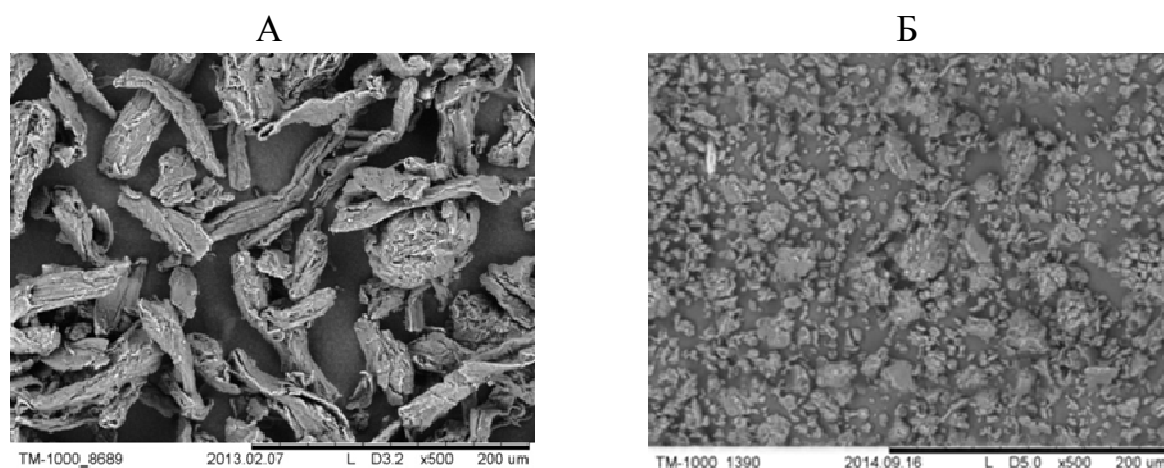


Рис. 1. РЭМ изображения целлюлозы до размола (А) и после размола (Б)

Был изучен состав гидролизатов, образующихся при гидролизе 80 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  при 25 °С мехактивированных целлюлозных продуктов, полученных пероксидной делигнификацией древесины березы. Как следует из приведенных в таблице 2 данных, выход глюкозы в гидролизатах составляет 57,2–61,0 % мас, ксилозы 16,5–21,0 % мас. и маннозы 1,5–2,0 % мас. Наличие в гидролизатах ксилозы подтверждает сохранение значительного количества гемицеллюлоз в целлюлозном продукте, полученном одностадийной пероксидной делигнификацией древесины березы при 100 °С. Об этом свидетельствует и присутствие в гидролизатах фурфурола в количестве 0,5–0,7 г/л (табл. 2).

Таблица 2. Состав гидролизатов, полученных гидролизом целлюлозных продуктов пероксидной делигнификации исходной древесины березы 80 %  $H_2SO_4$  при 25 °С

Номер образца *	Конверсия, % мас.	Выход, % мас.**						Содержание, г/л					
		глюкоза	ксилоза	манноза	5-ГМФ	фурфурол	левулиновая кислота	глюкоза	ксилоза	манноза	5-ГМФ	фурфурол	левулиновая кислота
1	96,2	57,2	16,5	2,0	0,3	0,6	0,20	61	17,5	2,2	0,3	0,7	0,2
2	95,1	50,6	19,5	1,7	0,3	0,7	с.к.	53	20,7	1,8	0,3	0,7	с.к.
3	94,0	61,0	21,0	1,5	0,3	0,5	0,42	65	22,5	1,6	0,4	0,5	0,5
* соответствует таблице 1, ** % от массы целлюлозного продукта, с.к. – следовые количества													

Таким образом, для получения из древесины березы качественных глюкозных гидролизатов необходимо предварительно осуществить кислотный гидролиз гемицеллюлоз. Проведенные ранее исследования показали, что при гидролизе древесины березы 2–3 %  $H_2SO_4$  при температуре 100 °С происходит преимущественно конверсия гемицеллюлоз с образованием ксилозы [41]. Выход ксилозы зависит от температуры гидролиза, концентрации сернокислотного катализатора и продолжительности процесса.

Максимальные выходы ксилозы (70,5–77,1 % мас. от исходного содержания гемицеллюлоз в березе) получены при температуре 100°С, концентрации  $H_2SO_4$  2–3 % мас. и продолжительности 4–5 ч. Выход целлюлозных продуктов, полученных путем интеграции стадий предгидролиза древесины и ее пероксидной делигнификации (табл. 3) составляет 40,7–43,4 % мас. Содержание остаточного лигнина и гемицеллюлоз в этих целлюлозных продуктах составляет не более 1 % мас. и 5,6–7,7 % мас., соответственно.

Таблица 3 – Влияние продолжительности процесса предгидролиза древесины березы на выход, состав и степень полимеризации целлюлозных продуктов, полученных путем интеграции стадий предгидролиза и пероксидной делигнификации древесины (условия предгидролиза: 3 %  $H_2SO_4$ , температура 100°C, гидромодуль 8; условия пероксидной делигнификации: катализатор 2% мас.  $H_2SO_4$ , температура 100°C, 5% мас.  $H_2O_2$ , 30 % мас.  $CH_3COOH$ , гидромодуль 15, продолжительность 3,5 ч)

Номер образца	Продолжительность предгидролиза, ч	Выход целлюлозного продукта*, % мас.	Состав продукта**, % мас.			СП***
			целлюлоза	гемицеллюлозы	лигнин	
4	3	43,4	89,7	7,7	0,8	350
5	4	42,6	90,5	6,8	0,5	310
6	5	40,7	93,0	5,6	0,4	270
*от массы древесины, ** от массы целлюлозного продукта, *** – степень полимеризации.						

Кислотный предгидролиз древесины березы, предшествующий ее пероксидной делигнификации, снижает степень полимеризации полученной целлюлозы до 270–350. Фракции целлюлозы с низкой степенью полимеризации (<200) очевидно переходят в реакционный раствор, что снижает выход целлюлозного продукта до 40,7–43,4 % мас.

Как и следовало ожидать, удаление значительной части гемицеллюлоз на стадии предгидролиза древесины улучшает качество получаемых глюкозных гидролизатов (табл. 4). Выход глюкозы при этом возрастает до 83,5 % мас., а ксилозы снижается до 5,4–7,2 % мас.

Таблица 4. Состав гидролизатов, полученных путем интеграции стадий предгидролиза и пероксидной делигнификации древесины березы и гидролиза полученного целлюлозного продукта

Номер образца*	Конверсия, % мас.	Выход, % мас.**						Содержание, г/л					
		глюкоза	ксилоза	манноза	5-ГМФ	фурфурол	левулиновая кислота	глюкоза	ксилоза	манноза	5-ГМФ	фурфурол	левулиновая кислота
4	94,2	80,4	7,2	0,8	0,4	0,3	с.к.	85,2	7,7	0,9	0,4	0,3	с.к.
5	97,9	81,8	6,6	1,1	0,4	0,2	с.к.	86,7	7,0	1,2	0,4	0,2	с.к.
6	97,3	83,5	5,4	0,4	0,5	0,2	с.к.	88,5	5,8	0,5	0,5	0,2	с.к.
* соответствует таблице 3, ** от массы целлюлозного продукта, с.к. – следовые количества													

Известно [41], что обработка целлюлозы водным раствором NaOH снижает степень упорядоченности кристаллической решетки целлюлозы и приводит к ее набуханию за счет частичного разрушения межмолекулярных водородных связей. Все это способствует растворению низкомолекулярных фракций целлюлозы и удалению остаточных гемицеллюлоз, сокристаллизованных с целлюлозой.

Как следует из приведенных в таблице 5 данных, щелочная обработка целлюлозного продукта водным раствором 18 % NaOH при температуре кипения снижает его выход до 30,6–40,5 % мас., уменьшает содержание в нем остаточных гемицеллюлоз до 1,7–2,5 % мас. и полностью удаляет лигнин. Целлюлозные продукты, обработанные щелочью, отличаются более высокой степенью полимеризации 550–640 (табл. 5).

Таблица 5. Выход, состав и степень полимеризации целлюлозных продуктов, полученных путем интеграции стадий предгидролиза и делигнификации древесины березы и щелочной обработки целлюлозного продукта

№ образца	Условия обработки	Выход продукта*, % мас.	Состав продукта**, % мас.			СП ***
			целлюлоза	гемицел- люлозы	лигнин	
7	<b>Предгидролиз:</b> 3% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , температура 100°C, гидромодуль 8, продолжительность 4 ч	30,6	95,5	2,5	0	550
8****	<b>Пероксидная делигнификация:</b> катализатор 2 % мас. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> температура 100°C, 30 % мас. CH <sub>3</sub> COOH, 5 % мас. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , гидромодуль 15, продолжительность 3,5 ч	40,5	93,1	1,7	0	640
*от массы древесины, ** от массы абс. целлюлозного продукта, *** – степень полимеризации, **** предгидролиз отсутствует.						

Известно, что при щелочной обработке целлюлозы в ней уменьшается количество низкомолекулярных фракций и происходит относительное увеличение содержания длинных фибрилл за счет растворения более коротких [42]. Вследствие этого уменьшается степень молекулярной

неоднородности целлюлозы. Кроме того, происходит частичное разволокнение целлюлозного продукта, что облегчает его последующий гидролиз.

Установлено, что гидролизаты, полученные интеграцией стадий предгидролиза и делигнификации древесины березы, щелочной обработки целлюлозного продукта и его кислотного гидролиза содержат наиболее высокую концентрацию глюкозы (91,0–93,8 г/л), низкую концентрацию ксилозы (1,8–2,5 г/л) и маннозы (0,2–0,3 г/л) (табл. 6).

Таблица 6. Состав гидролизатов, полученных путем интеграции стадий предгидролиза и делигнификации древесины березы, щелочной обработки и гидролиза полученного целлюлозного продукта

Номер образца *	Конверсия, % мас.	Выход, % мас.**						Содержание, г/л					
		глюкоза	ксилоза	манноза	5-ГМФ	фурфурол	левулиновая кислота	глюкоза	ксилоза	манноза	5-ГМФ	фурфурол	левулиновая кислота
7	98,5	88,5	2,3	0,3	0,4	с.к.	с.к.	93,8	2,5	0,3	0,5	с.к.	с.к.
8	98,0	86,4	1,6	0,2	0,5	с.к.	с.к.	91,0	1,8	0,2	0,6	с.к.	с.к.
* соответствует таблице 5, ** % от массы целлюлозного продукта, с.к. – следовые количества													

Нежелательными примесями в гидролизатах, которые ингибируют процессы ферментации глюкозы в биоэтанол, являются фурфурол, образующийся из пентоз и уроновых кислот, 5-ГМФ, образующийся из гексоз, левулиновая кислота, образующаяся из 5-ГМФ в соответствии со следующей схемой (рис. 2).

В результате проведенного исследования установлено, что из целлюлозных продуктов с низким содержанием лигнина и гемицеллюлоз образуются глюкозные гидролизаты с малой концентрацией нежелательных примесей.



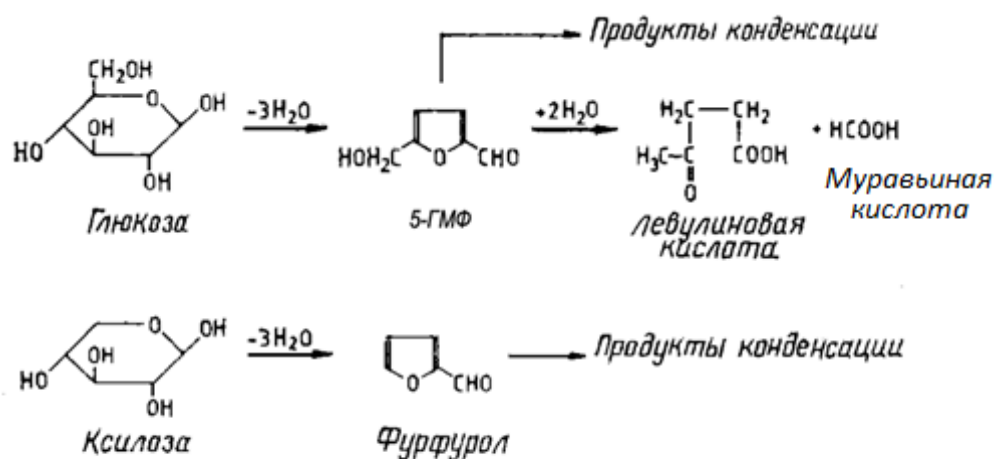


Рис. 2. Схема кислотной конверсии глюкозы с образованием примесей, ингибирующих ферментативный синтез биоэтанола [43]

По данным метода ВЭЖХ концентрация 5-ГМФ во всех изученных гидролизатах находится в пределах 0,3-0,6 г/л. Наиболее высокую концентрацию фурфурола (0,7 г/л) содержат гидролизаты, полученные пероксидной делигнификацией исходной древесины березы (табл. 2). Минимальные концентрации фурфурола характерны для гидролизатов 7 и 8 (табл. 6), полученных из целлюлозных продуктов с низким содержанием гемицеллюлоз (табл. 5).

Данные об относительном содержании микропримесей органических соединений в полученных гидролизатах приведены в таблице 7. Основными из них являются фурфурол и 5-гидроксиметилфурфурол, относительное содержание которых составило в гидролизатах 1–3, соответственно, 76,9–88,7 % отн. и 4,4–11,7 % отн., а в гидролизатах 4–8, соответственно, 15,3–48,3 % отн. и 38,9–66,2 % отн. Повышенное содержание фурилэтилкетона (18,3–18,5 % отн.) характерно для гидролизатов 7–8. Остальные детектированные вещества присутствуют в гидролизатах в незначительных количествах (табл. 7).

Таблица 7 – Относительное содержание микропримесей органических соединений в гидролизатах, полученных гидролизом 80 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> различных по составу целлюлозных продуктов. Номера образцов соответствуют таблицам 1,3,5

Соединение	Время выхода, мин	Номер образца целлюлозного продукта							
		1	2	3	4	5	6	7	8
		содержание, % отн.*							
1- гидроксн -2-пропанон (Ацетол)	3,53	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.
3-метилфуран метиловый эфир	4,59	0,2	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
2 – оксопропановой (пировиноградной) кислоты	6,10	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.
2-фуранкарбальдегид (фурфурол)	7,08	88,7	86,3	76,9	48,3	43,2	46,2	15,3	21,5
2-фурилметанол (фурфуриловый спирт)	8,30	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.
1,2 – циклопентан-дион	11,03	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.
5 - метилфуран-карбоксиальдегид	12,72	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.
левулиновая кислота	17,49	2,7	0,1	9,7	0,1	с.к	4,3	с.к	с.к
2,5 – фуранкар-боксиальдегид	17,63	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.
1-(2-фуранил)-1-пропанол (фурил этил кетон )	17,78	4,0	3,1	1,1	с.к.	7,5	7,8	18,3	18,5
1,6-ангидро-3,4-дидезокси-β-D-пиранозен-2-он (левоглюкозенон)	18,87	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.	с.к.
5-гидроксиметил-фурфурол	22,72	4,4	10,3	11,7	51,5	38,9	41,9	66,2	60,1
*в % от суммы площадей всех детектируемых пиков микропримесей, с.к. – следовые количества									

Из полученных данных следует, что содержание в гидролизатах фурфурола и 3–метилфурана снижается в ряду образцов 1 → 8, вследствие уменьшения содержания гемицеллюлоз при переходе от целлюлозных продуктов, полученных одностадийным методом пероксидной делигнификации древесины березы к целлюлозным продуктам двух и трехстадийных методов получения.

Известно, что одним из наиболее токсичных компонентов гидролизатов, используемых для ферментативного синтеза биоэтанола,

является фурфурол [44]. Установлено [45], что его допустимая концентрация в гидролизате, предназначенном для синтеза биоэтанола, не должна превышать 0,5 г/л. Допустимые концентрации 5-ГМФ и левулиновой кислоты в гидролизате составляют <1,0 г/л [46] и <15,0 г/л [47] соответственно. Гидролизаты 4–8 (таблицы 4 и 6), полученные из древесины березы двух и трехстадийными методами, удовлетворяют этим требованиям. Концентрации 5-ГМФ и левулиновой кислоты во всех изученных образцах гидролизатов (1–8) существенно ниже допустимых значений.

### Заключение

Установлено, что состав целлюлозных продуктов оказывает существенное влияние на качество получаемых гидролизатов – выход глюкозы, ксилозы и количество примесей, ингибирующих процессы ферментации гидролизатов в биоэтанол.

Из целлюлозных продуктов, полученных одностадийной пероксидной делигнификацией древесины березы, не удалось получить качественные гидролизаты. В этих гидролизатах доля пентоз составляет около 30% от содержания гексоз, следовательно, прогнозируемый выход биоэтанола будет ниже, поскольку  $C_5$  сахара не усваиваются основным штаммом спиртообразующих дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Содержание фурфурола в данных гидролизатах составляет 0,5–0,71 г/л, что превышает его допустимую концентрацию в растворах сахаров, предназначенных для ферментативного синтеза биоэтанола.

Максимальные выходы глюкозы (80,4–88,5 % мас.) достигнуты при гидролизе целлюлозных продуктов, при получении которых использовали стадии предварительного гидролиза гемицеллюлоз древесины, пероксидной делигнификации предгидролизованной древесины и обработку полученного целлюлозного продукта раствором щелочи, либо стадии пероксидной делигнификации древесины и обработки полученного целлюлозного продукта раствором щелочи. Содержание 5-ГМФ и фурфурола в этих

гидролизатах составляет 0,39–0,56 г/л и 0,04–0,31 г/л соответственно, что существенно ниже допустимых значений. Левулиновая кислота в данных гидролизатах присутствует в следовых количествах.

Исследование выполнено за счет средств Российского научного фонда (проект № 16-13-10326).

### Литература

1. *Almeida J., Modig T., Petersson A., Hähn-Hägerdal B., Liden G., Gorwa-Grauslund M.* // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2007. V. 82. P. 340–349.
2. *Lin Y., Tanaka S.* // Appl. Microbial. Biotechnol. 2006. V. 69. P. 627–642.
3. *Taherzadeh M.J., Karimi K.* // BioResources. 2007. V. 2. N 3. P.472–499.
4. *Fengel D., Wegener G.* Wood: chemistry, ultrastucture, reactions. 1984. Walter de Grueter. Berlin.
5. *Hu G., Heitmann J. A., Rojas O.* // BioResources. 2008. V. 3. N 1. P.270–294.
6. *Кузнецов Б.Н., Кузнецова С.А., Данилов В.Г., Тарабанько В.Е.* // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. Т. 13. № 4. С. 531–539. [*Kuznetsov B.N., Kuznetsova S.A., Danilov V.A., Taraban'ko V.E.* // Chemistry for Sustainable Development. 2005. V. 13. N 4. P. 531-539].
7. *Brazdausks P., Puke M., Vedernikovs N., Kruma I.* // Environmental and climate technologies. 2013. V. 11. P. 478–485.
8. *Li H., Saeed A., Jahan S., Ni J., Heiningen A.* //Journal of Wood Chemistry and Technology. 2010. V. 30. P.48–60.
9. *Amiri H., Karimi K.* //Industrial & Engineering Chemistry Research. 2013. V.52. P.11494-11501.
10. *Barana D., Salanti A., Orlandi M., Ali D.S., Zoia L.* // Industrial Crops and Products. 2016. V. 86. P. 31–39.

11. *Singh D.P., Trivedi R.K.* // Int. J. Chem. Tech. Res. 2013. V. 5. N 2. P. 727–734.
12. *Guo B., Zhang Y., Yu G., Lee W.H., Jin Y.-S., Morgenroth E.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2013. Vol. 169. P. 1069–1087.
13. *Bose S.K., Barber V.A., Ericka F.A.* // Carbohydrate Polymers. 2009. V. 78. P. 396–401.
14. *Borrega M., Nieminen K., Sixta H.* // BioResource. 2011. V. 6. N 2. P. 1890–1903.
15. *Hamelinck C.N., Hooijdonk G., Faaij A.P.C.* // Biomass and Bioenergy. 2005. V. 28. P. 384–410.
16. *Kuznetsov B. N., Tarabanko V.E., Kuznetsova S. A.* // Kinetic and Catalysis. 2008. V. 49. P. 517–526.
17. *Kuznetsov B. N., Kuznetsova S. A., Danilov V. G., Yatsenkova O. V.* // React. Kinet. Mech. Cat. 2011. 104. P. 337–343.
18. *Kuznetsov B. N., Sudakova I.G., Garyntseva N.V., Djakovitch L., Pinel C.* // React. Kinet. Mech. Cat. 2013. V. 110. P. 271–280.
19. *Yang Z., Kang H., Guo Y. et al.* // Industrial Crops and Products. 2013. V. 46. P. 205–209.
20. *Zhao X., Zhou Y., Liu D.* // Bioresource Technology. 2012. V. 105. P. 160–168.
21. *Bujang N., Rodhi M.N.M., Musa M. et al.* // Procedia Engineering. 2013. V. 68. P. 372–378.
22. *Яценкова О.В., Пен Р.З., Чудина А.И., Скрипников А.М., Кузнецов Б.Н.* // Химическая технология. 2015. № 11. С. 686–693. [*Yatsenkova O.V., Pen R.Z., Chudina A.I., Skripnikov A.M., Kuznetsov B.N.* // Khimicheskaya technologiya. 2015. N 11. P. 686–693].
23. *Shin S-J, Park J-M, Cho DH, Kim YH, Cho N-S.* // J Korean Wood Sci Technol, 2009. V. 37. P.578–584.
24. *Iranmahboob J, Nadim F, Monemi S.* // Biomass Bioenergy. 2002. V. 22. N 5. – P. 401–404.

25. Yoon S.-Y., Han S.-H., Shin S.-J. // *Energy*. 2014. V. 77. P. 19–24.
26. Яценкова О.В., Пен Р.З., Скрипников А.М., Береговцова Н.Г., Кузнецов Б.Н. // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2016. Т. 24. С. 811–819. [Yatsenkova O.V., Pen R.Z., Skripnikov A.M., Beregovtsova N.G., Kuznetsov B.N. // *Chemistry for Sustainable Development*. 2016. V. 24. P. 811–819].
27. Jeffries T. // *Curr. Opin. Biotech.* 2006. V.17. N 3. P.320–326.
28. Wijaya Y., Putra R., Wijaya V., Ha J.-M., Suh D., Kim Ch. // *Bioresource technology*. 2014. V.164. P.221–231.
29. Sluiter J. B., Ruiz R. O., Scarlata CH. J., Sluiter A. D., Templeton D. W. // *J. Agric. Food Chem.* 2010. V.58. P. 9043–9053.
30. Hallac B.B., Ragauskas A.J. // *Biofuels Bioprod Bioref.* 2011. V.5. P. 215–225.
31. Ruiz-Matute A.I., Hernandez-Hernandez O., Rodriguez-Sanchez S., Sanz M.L., Martinez-Castro I. // *J. Chromatogr. B*. 2011. V. 879. P. 1226–1240.
32. Wang H., Zhang C., He H., Wang L. // *J Environmental Sci.* 2012. V. 24. N 3. P. 473–478.
33. Барам Г.И. В книге: 100 лет хроматографии / Отв. ред. Руденко Б.А. 2003. М.: Наука. С. 32–45. [Baram G.I. In book: 100 years of chromatography. Moscow: Nauka. P. 32–45.
34. Харина М. В., Емельянов В. М., Аблаев А.Р., Мошкина Н.Е., Ибрагимова Н.Н., Горшкова Т.А. // *Химия растительного сырья*. 2014. №1. С. 53–59. [Kharina M.V., Emelyanov V.M., Ablaev A.R., Moshkina N.E., Ibragimova N.N., Gorshkova T.A. // *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja*. 2014. N 1. P. 53–59].
35. Klinke H.B., Thomsen A.B., Ahring B.K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. Vol. 66. P. 10–26.
36. Гарынцева Н.В., Судакова И.Г., Кузнецов Б.Н. Изучение каталитической делигнификации древесины березы пероксидом водорода при атмосферном давлении. Ж. Сибирского федерального университета. Химия. 2015. Т. 8. № 3. С. 422–429. [Garyntseva N.V., Sudakova I.G., Kuznetsov

B.N. // Journal of Siberian Federal University. Chemistry. 2015. V. 8. N. 3. P. 422–429].

37. Hilgert, J., Meine, N., Rinaldi, R., Schüth, F. // Energy & Environmental Science. 2013. V. 6. P. 92–96.

38. Hu Hua-yu, Chen Yan-meng, Zhang Yan-juan // J. Chem. Pharm. Res. 2013. V. 5. N 12. P.129–134.

39. Carrasquillo-Flores R., Käldestrom M., Schüth F. //ACS Catalysis. 2013. V. 3. P. 993–997.

40. Яценкова О.В., Чудина А.И., Скрипников А.М., Чесноков Н.В., Кузнецов Б.Н. // Журнал СФУ. Химия. 2015. Т. 8. № 2. С. 211–221. [Yatsenkova O.V., Chudina A.I., Skripnikov A.M., Chesnokov N.V., Kuznetsov B.N. // Journal of Siberian Federal University. Chemistry. 2015. V. 8. N. 2. P. 211–221].

41. Kim J. S., Lee Y.Y., Kim T. H. // Bioresource Technology. 2016. V. 199. P. 42–48.

42. Knill Ch. J., Kennedy J. F. // Carbohydrate Polymers. 2003. V. 51. N 3. P. 281–300.

43. Chen R., Wang Y.-Zh., Liao Q., Zhu X., Xu T.-F. // BMB Reports. 2013. V. 46. N 5. P. 244–251.

44. Mills T.Y., Sandoval N.R., Gill R.T. // Biotechnology for Biofuels. 2009. V. 2. P.26–36.

45. Huang H., Guo X., Li D., Liu M., Wu J., Ren H. // Bioresource Technology. 2011. V. 102. P. 7486–7493.

46. Zha Y., Westerhuis J.A., Muilwijk B., Overkamp K.M., Nijmeijer B.M., Coulter L., Smilde A. K., Punt P.J. // BMC Biotechnology. 2014. V. 14. P.22–38.

47. Zha Y., Muilwijk B., Coulter L., Punt P.J. //J Bioprocessing & Biotechniques. 2012. V. 2. N 1. P.112–122.